

PENGELOMPOKAN SEPULUH VARIETAS TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum*) BERDASARKAN KERAGAMAN RUNUTAN BASA PARSIAL GEN *PMT* (*PUTRESCINE N-METHYLTRANSFERASE*)

Clustering of the ten tobacco (Nicotiana tabacum) varieties based on the partial PMT (putrescine N-methyltransferase) gene sequences diversity

SESANTI BASUKI¹ DAN SUDARSONO²

¹ Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat, Jl. Raya Karangploso km 4,
Kotak Pos 199, Malang 65100

²Departemen Agronomi dan Hortikultura,
Faperta, IPB, Jl. Meranti-Kampus Darmaga, Bogor 16680

Email: sesanti.basuki@gmail.com

Diterima: 16-02-2017; Direvisi: 28-02-2017; Disetujui: 24-03-2017

ABSTRAK

Gen *PMT* adalah gen penyandi enzim putresina N-metiltransferase (*PMT*) yang berperan dalam lintasan biosintesis nikotin pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*). Sepuluh varietas tembakau yang memiliki perbedaan tingkat kadar nikotin diuji untuk mempelajari: 1) keragaman runutan basa parsial gen *PMT* dari masing-masing varietas, dan 2) pengelompokan sepuluh varietas tembakau yang diuji berdasarkan keragaman runutan basa parsial gen *PMT*. Keragaman runutan basa dianalisis dengan mensejajarkan data runutan basa dari sepuluh varietas tembakau yang diuji dengan runutan basa dari *Nipmt_Sindoro1* (JQ438825) yang telah tersimpan dalam database *genbank NCBI*. Hasil pensejajaran digunakan untuk menghitung matriks jarak, yang selanjutnya digunakan untuk menganalisis pengelompokan sepuluh varietas tembakau. Hasil analisis memperlihatkan adanya variasi ukuran dan jumlah runutan basa parsial gen *PMT* asal sepuluh varietas tembakau yang dianalisis. Hasil analisis juga memperlihatkan bahwa runutan basa parsial gen *PMT* tersebut berasal/diturunkan dari sumber (*ancestor*) yang sama yang terkait dengan biosintesis nikotin pada tembakau. Runutan basa parsial gen *PMT* dari sepuluh varietas yang dianalisis memisahkan antara kelompok tembakau introduksi (kadar nikotin rendah-sedang) dengan kelompok tembakau lokal (kadar nikotin sedang-tinggi). Dua kelompok memisah berdasarkan level kadar nikotin, dan perbedaan/perubahan susunan basa pada situs-situ tertentu dari runutan basa parsial gen *PMT* yang dianalisis. Informasi tentang mutasi yang terjadi pada situs-situs runutan basa dari parsial gen *PMT* dapat digunakan untuk mempelajari keterkaitan antara perubahan basa pada fragmen gen *PMT* dengan kandungan nikotin total tembakau yang terjadi selama proses evolusi.

Kata kunci: Analisis pengelompokan, gen *PMT*, Nikotin, *Nicotiana tabacum*

ABSTRACT

PMT gene is the gene encoded putrescine N-methyltransferase which is related to nicotine biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum*). Ten tobacco varieties with different nicotine level were used in this study. The aims of this study were: 1) to analyze the partial *PMT* gene sequence diversity among ten tobacco varieties, and 2) to evaluate the closed-relationship among ten tobacco varieties based on their partial *PMT* gene sequences diversity. Sequence diversity was analyzed by multiple sequence alignment between the partial *PMT* gene sequence of the ten tobacco varieties and *Nipmt_Sindoro1* sequence (JQ438825) deposited in the NCBI gene-bank database. The phylogenetic relationship among the sequences was inferred by genetic distance between pairs of sequences using the pairwise and multiple sequence alignment analysis. Analysis of the sequences showed that all varieties analyzed had varied in size and number of the *PMT* gene fragments yielded. The analysis also revealed

that the partial *PMT* gene sequences are coming from the same ancestor which related to nicotine biosynthesis in tobacco. Phylogenetic analysis separated the partial *PMT* gene sequences into two different branches significantly (bootstrap value = 100), and clustered together based on tobacco types with different nicotine level in which could be due to some bases changed on the specific sites of the *PMT* gene sequences. This information could be used to study the relationship between some bases changed on the specific sites of the *PMT* gene sequences and the nicotine content variation yielded by the ten tobacco varieties that are happened during evolution time.

Keywords: Clustering analysis, *PMT* gene, nicotine, *Nicotiana tabacum*.

PENDAHULUAN

Kemajuan ilmu genomik saat ini mendukung penggunaan teknologi dan metode yang lebih maju pada studi-studi genetika. Salah satu kegiatan yang rutin dilakukan seiring kemajuan penelitian di bidang genomik adalah kegiatan perunutan basa (sekuensing) pada gen-gen yang terkait dengan sifat-sifat penting dari berbagai spesies tanaman (Bombarely et al. 2012). Kegiatan perunutan basa dilakukan untuk memperoleh data runutan basa yang dapat digunakan untuk mempelajari keragaman dalam gen struktural pada tingkat runutan basa DNA (Edwards and Batley 2010). Keuntungan informasi berdasarkan runutan basa adalah dapat menentukan nilai parameter keragaman genetik yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Charlesworth et al. 2001).

Teknologi sekuensing yang dilakukan secara paralel dengan metode bioinformatika dapat menghasilkan informasi pola-pola variasi runutan basa dalam atau antar spesies dari suatu populasi tanaman (Dekkers and Hospital 2002). Pola-pola tersebut dapat digunakan untuk mempelajari hubungan kekerabatan diantara runutan basa-runutan basa dari lokus yang sama pada individu yang berbeda, karena variabilitas nukleotida mencerminkan variasi genetik dalam suatu populasi (Champhell et al. 2015). Sampai saat ini, pohon kekerabatan (*phylogenetic tree*) adalah metode yang belum tergantikan untuk

menganalisis hubungan kekerabatan di antara genotipe mahluk hidup berdasarkan runutan basa dari genom atau gen yang terkait sifat tertentu (Vamdamme et al 2009; Tate et al. 2009).

Gen *PMT* adalah gen penyandi enzim putresina N-metiltransferase, yaitu satu dari dua enzim kunci dalam lintasan biosintesis nikotin pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*). Karakterisasi terhadap runutan basa dari gen *PMT* oleh Hashimoto et al. (1998) memperlihatkan bahwa keragaman runutan basa dapat digunakan sebagai dasar pengelompokan spesies-spesies dari genus *Nicotiana*. Beberapa peneliti yang pernah melakukan karakterisasi terhadap gen-gen yang terkait dengan sifat penting pada tanaman menyatakan bahwa karakterisasi lebih lanjut pada level genomik dari gen-gen yang terkait dengan sifat penting pada tanaman dapat digunakan untuk mengetahui heterogenitas pada tingkat basa dari gen-gen yang dianalisis (Chen et al. 2007; Robertson et al. 2011; Wu and Tanksley 2010).

Tembakau yang berkembang di Indonesia dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu kelompok tembakau introduksi, dan tembakau lokal. Kedua kelompok tembakau tersebut dapat dibedakan berdasarkan karakter morfologi, kadar nikotin total, dan cara memprosesnya. Tembakau introduksi umumnya diproses dalam bentuk krosok, sedangkan tembakau lokal diproses dalam bentuk rajangan. Secara genetik, kadar nikotin total tembakau introduksi masuk ke dalam kriteria rendah sampai sedang (Leffingwell 1999), sedangkan tembakau lokal, pada umumnya memiliki kadar nikotin total dengan kriteria sedang sampai tinggi (Basuki et al. 2005).

Penelitian tentang aktivitas gen *PMT* yang terkait dengan kadar nikotin total tembakau pernah dilakukan menggunakan varietas tembakau yang memiliki kadar nikotin total dengan kriteria rendah sampai sedang (Hibi 1994), tetapi penelitian yang mempelajari keragaman runutan basa gen *PMT* yang terkait dengan kadar nikotin total pada beberapa varietas tembakau yang memiliki kadar nikotin dengan kriteria sedang sampai tinggi belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan mempelajari: 1) keragaman runutan basa parsial gen *PMT* dari sepuluh varietas tembakau dengan kriteria tingkatan kadar nikotin rendah-sedang-tinggi, dan 2) pengelompokan sepuluh

varietas tembakau yang diuji berdasarkan keragaman runutan basa parsial gen *PMT*. Evaluasi pada runutan basa parsial gen *PMT* dengan kriteria tingkatan kadar nikotin rendah-sedang-tinggi diharapkan dapat membantu memahami keterkaitan antara perubahan basa pada fragmen gen *PMT* sebagai penyandi enzim putresina N-metiltransferase dengan variasi kadar nikotin total yang dihasilkan oleh sepuluh varietas tembakau yang dianalisis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura (AGH), Fakultas Pertanian, IPB Bogor pada tahun 2011 - 2012 dan analisis lanjutan dilakukan di Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Molekuler, Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat pada tahun 2014.

Bahan Tanaman dan Isolasi DNA Genom (*gDNA*)

Materi genetik yang digunakan berasal dari koleksi Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat, Malang yang terbagi dalam tiga tipe tembakau, yaitu 1) tembakau lokal, terdiri dari: enam varietas (Sindoro1, Kemloko1, Kemloko2, Kemloko3, Bligon1, dan Grompol Jatim1); 2) tembakau Virginia (NC95 dan K399); dan 3) tembakau oriental dan semi-oriental (Ismir dan Iwanowsko Seme). Sepuluh varietas tembakau yang digunakan memiliki kandungan nikotin yang bervariasi (Tabel 1).

DNA genom diisolasi dari daun pucuk bibit tembakau yang telah berumur 30 hari atau telah memiliki empat daun yang telah terbuka. Isolasi DNA dilakukan menggunakan reagen DNAzol (Invitrogen), mengikuti petunjuk baku yang diberikan. Konsentrasi relatif dan kualitas DNA diestimasi dengan metode perbandingan menggunakan 100 ng dan λ DNA standar (Fermentas) yang dielektroforesis bersama-sama dengan sampel DNA pada gel agarose 1% di dalam buffer TBE 0,5X. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan arus 100 V selama 20 menit. Sampel DNA selanjutnya dilarutkan dalam TE-buffer dan digunakan sebagai cetakan (*template*) pada reaksi PCR.

Tabel 1. Tipe tembakau, nama varietas, dan keragaman kadar nikotin dari sepuluh varietas tembakau yang diuji

Table 1. Tobacco type and varieties name with different nicotine content (%) of ten tobacco varieties used

No No	Tipe tembakau Tobacco types	Nama varietas Varieties names	Kadar nikotin Nicotine content (%)	Tingkatan kadar nicotine Nicotine content level
1	Lokal	Sindoro1	5,8	Sedang-Tinggi
		Kemloko1	6,2	
		Kemloko2	5,5	
		Kemloko3	6,0	
		Bligon1	3,5	
		Grompol Jatim1	3,6	
2	Virginia	NC95	3,0	Sedang
		K399	2,8	
3	Oriental Semi-oriental	Ismir	~ 1	Rendah – Sedang
		I. Seme	2,8	

Sumber: SK. Menteri Pertanian (2001, 2001a, 2005, 2005a, 2007, 2007a), Leffingwell (1999)

Amplifikasi PCR, Kloning dan Perunutan Basa DNA Produk PCR

Pasangan primer *degenerate* digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen *PMT* sepanjang ekson2 sampai dengan ekson8, yaitu F: 5'-TCT GAYTACCAAGATGTCA-3'; R:5'-GCGAAAGATGGYAAAATGAA-3', dimana Y=C atau T (Basuki et al. 2011). Reaksi PCR dibuat dengan volume total 25 µl, dengan komposisi reagensia adalah: 25 ng gDNA, PCR buffer 1x, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, primer *degenerate forward* dan *reverse* masing-masing 5 mM, dan 1 unit *Taq DNA polymerase*. Amplifikasi PCR diawali dengan satu siklus tahap pre-denaturasi 94°C selama 3 menit, diikuti dengan 30 siklus yang terdiri atas: tahapan denaturasi pada suhu 94°C selama 10 detik, penempelan primer pada suhu 52°C - 57°C selama 1 detik, pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 1 detik. Pada tahap akhir proses PCR dilakukan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 5menit.

Hasil produk PCR dikonfirmasi menggunakan gel agarose 1% dalam buffer TBE 0.5X yang dielektroforesis dengan tegangan arus 100 V selama 45 menit. Pita DNA divisualisasi menggunakan pewarnaan *gel reed* (Biontium), di bawah sinar UV, dan didokumentasikan menggunakan UV illumination (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Hasil amplifikasi PCR dari fragmen gen *PMT* yang didapat, selanjutnya dikirim ke *1st Base Pte. Ltd.* Malaysia untuk dilakukan kegiatan kloning dan perunutan basa DNA.

Analisis Runutan Basa

Data runutan basa yang diperoleh dianalisis dengan membandingkan atau mensejajarkan data runutan basa fragmen gen *PMT* dari sepuluh varietas tembakau dengan runutan basa dari *Ntpmt_Sindoro1* (JQ438825) yang telah dipublikasikan secara *on-line* (<http://www.NCBI.nlm.nih.gov/genbank>) dan tersimpan dalam *data base* dari *genbank NCBI* (*National Centre for Biotechnology Institute*). Analisis pensejajaran untuk

mengidentifikasi kebenaran runutan basa-runutan basa fragmen gen *PMT* menggunakan program *BlastN* (McGinnis and Madden 2004). Runutan basa DNA dari fragmen gen *PMT* asal sepuluh varietas tembakau selanjutnya dianalisis untuk menentukan matriks jarak (*distance matrix*) di antara sepuluh varietas tembakau yang dianalisis menggunakan program CLUSTAL (http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html; (Thompson et al. 1994).

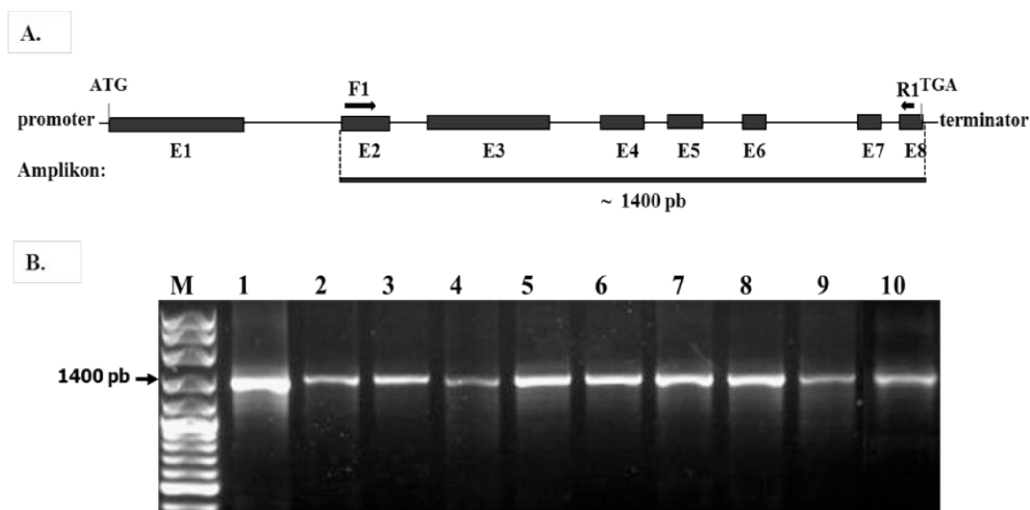
Analisis Pengelompokan

Pengelompokan dilakukan dengan membangun konstruksi pohon kekerabatan menggunakan metode *neighbour-joining* (Saitou and Nei 1987) pada program MEGA3 (Kumar et al. 2004) berdasarkan matriks jarak yang diperoleh dari hasil analisis pensejajaran menggunakan program CLUSTAL (http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html). Nilai bootstrap (1000 kali pengulangan) digunakan untuk menguji keakuratan pohon kekerabatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi PCR Partial Gen *PMT* asal DNA Genom Sepuluh Varietas Tembakau

Pasangan primer *degenerate* memberikan reaksi positif pada analisis elektroforesis, dan semua cetakan yang berasal dari sepuluh varietas tembakau, dan menghasilkan fragmen tunggal dengan ukuran ~ 1400 pasang basa (Gambar 1). Panjang fragmen yang dihasilkan sesuai dengan panjang runutan basa (ekson 2 sampai dengan ekson 8) dari parsial gen *PMT* yang dapat diamplifikasi. Hasil amplifikasi juga memperlihatkan bahwa fragmen gen *PMT* sepanjang ekson 2 sampai dengan ekson 8 tidak memiliki pasangan basa berulang yang dapat menginterupsi proses amplifikasi PCR.



Gambar 1. Representasi hasil amplifikasi fragmen gen *PMT* dari sepuluh varietas tembakau . (A) Diagram gen *PMT*, posisi primer (F1 dan R1) pada daerah ekson (E1-E8), dan perkiraan panjang produk amplifikasinya. (B) Elektroforegram hasil amplifikasi PCR fragmen gen *PMT* asal DNA genom sepuluh varietas tembakau menggunakan sepasang primer *degenerate*. M=100 bp DNA ladder: 400, **500**, 600, 700, 800, 900, **1000**; 1200; 1500; 2000; 2500; 3000. 1,2,3,4,5,6=DNA genom varietas tembakau lokal (Sindoro1, GJatim1, Bligon1, Kemloko1, Kemloko2, dan Kemloko3); 7, 8 = tembakau oriental/semi-oriental (Ismir dan I. Seme), 9, 10=tembakau virginia (NC95 dan K399).

Figure 1. *PMT* gene fragment amplicon of ten tobacco varieties representation. (A) *PMT* gene diagram, primer pairs (F1 and R1) position at the exons (E1-E8), and the length of PCR product estimation. (B) Electroforegram of *PMT* gene fragment amplification PCR product derived from DNA of the ten tobacco varieties using *degenerate* primer pairs. M=100 bp DNA ladder: 400, **500**, 600, 700, 800, 900, **1000**; 1200; 1500; 2000; 2500; 3000. 1,2,3,4,5,6=local tobacco varieties (Sindoro1, GJatim1, Bligon1, Kemloko1, Kemloko2, and Kemloko3); 7, 8 =oriental/semi-oriental tobacco (Ismir and I.Seme), 9, 10= virginia tobacco (NC95 and K399).

Analisis Runutan Basa Partial Gen *PMT* asal DNA Genom Sepuluh Varietas Tembakau

Perunutan basa DNA genom asal sepuluh varietas tembakau menghasilkan ukuran dan jumlah runutan basa yang bervariasi. Varietas K399 dan NC95 menghasilkan jumlah runutan basa lebih dari satu. Varietas K399

menghasilkan dua runutan basa (K399_a dan K399_b), sedangkan varietas NC95 menghasilkan empat runutan basa (NC95_1, NC95_2, NC95_3, NC95_4) (Tabel 2). Analisis perunutan basa pada sepuluh varietas tembakau menghasilkan 14 runutan basa secara keseluruhan.

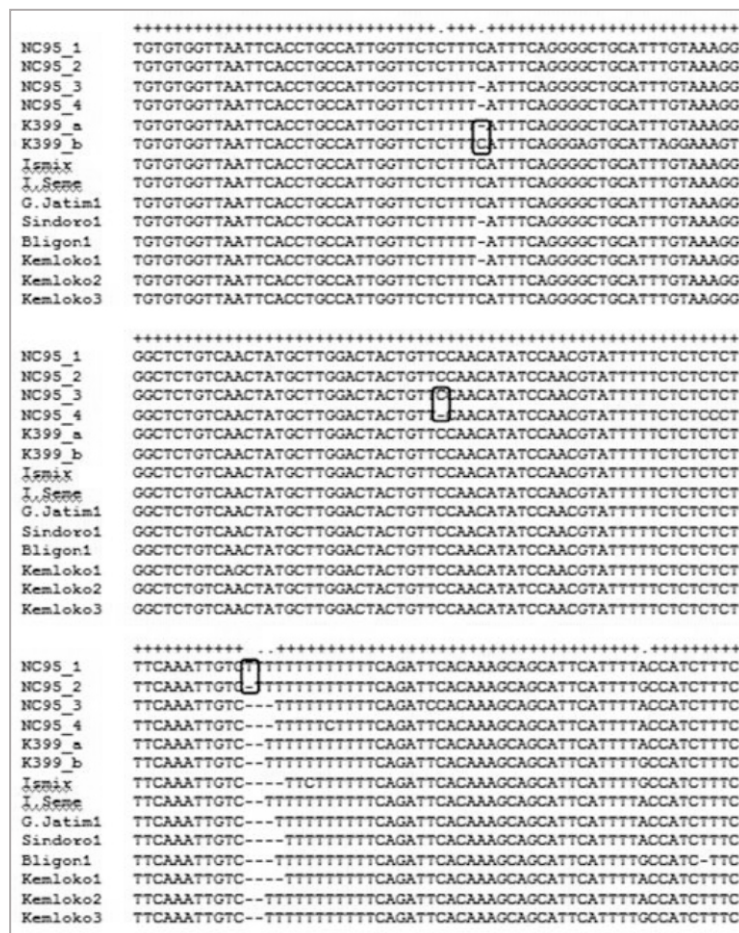
Tabel 2. Variasi runutan basa gen *PMT* dari DNA genom sepuluh varietas tembakau.

Tabel 2. *PMT* gene sequences variation of ten tobacco varieties.

No No	Nama Varietas Name of varieties	Jumlah runutan basa Number of sequences	Panjang runutan basa (pasang basa) Length of sequences (base pairs)
1	Sindoro1	1	1408
2	Kemloko1	1	1411
3	Kemloko2	1	1418
4	Kemloko3	1	1413
5	Grompol Jatim1	1	1417
6	Bligon1	1	1416
7	K399	2	
	- K399_a		1417
	- K399_b		1418
8	NC95	4	
	- NC95_1		1422
	- NC95_2		1421
	- NC95_3		1407
	- NC95_4		1406
9	I. Seme	1	1418
10	Ismir	1	1412

Keragaman dalam jumlah dan ukuran runutan basa DNA gen PMT pada sepuluh varietas tembakau yang dianalisis diduga terkait dengan sejarah persilangan dari varietas-varietas tembakau yang digunakan. Enam varietas lokal dan dua varietas tembakau oriental/semi-oriental yang digunakan pada penelitian ini bukan berasal dari turunan hasil persilangan, kecuali varietas Kemloko 1, 2, dan 3 yang berasal dari populasi turunan satu kombinasi persilangan (Rochman 2013). Adapun varietas K 399 dan NC 95 adalah varietas hasil seleksi dari populasi turunan yang berasal dari beberapa kombinasi hasil persilangan (Bowman et al. 1984; Moore 2013). Keragaman dalam jumlah dan ukuran runutan basa DNA yang terkait dengan sejarah persilangan, diduga terjadi karena pindah silang yang tidak setara pada proses rekombinasi dari satu generasi ke generasi berikutnya, dan berlangsung selama beberapa generasi. Selain itu, analisis pensejajaran terhadap

runutan basa untuk menentukan variasi konsensus runutan basa DNA berdasarkan daerah ekson dan intron memperlihatkan adanya gap-gap pada runutan basa fragmen gen PMT dari sepuluh varietas yang dianalisis. Gap-gap tersebut menunjukkan telah terjadi perubahan susunan basa pada situs-situs tertentu dari runutan basa fragmen gen PMT (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan adanya mutasi yang terjadi karena insersi (penambahan basa), dan/atau delesi (penghilangan basa) pada runutan basa-runutan basa yang dianalisis. Dari dua tipe mutasi yang ditemukan, penghilangan basa (delesi) pada situs-situs tertentu dari runutan basa fragmen gen PMT ditemukan pada runutan basa yang berasal dari DNA genom varietas K 399 dan NC 95 (Gambar 2). Variasi perubahan basa pada situs-situs tertentu dari dua varietas tersebut menyebabkan adanya variasi pada ukuran runutan basa yang dihasilkan (Tabel 2).



Gambar 2. Hasil pensejajaran runutan basa-runutan basa fragmen gen PMT yang berasal dari sepuluh varietas tembakau. Basa yang identik (terkonservasi) ditandai dengan tanda positif (+). Sedangkan basa yang tidak terkonservasi ditandai dengan tanda baca titik (.). Insersi/delesi satu basa pada runutan basa-runutan basa dari varietas-varietas tembakau Virginia ada di dalam kotak.

Figure 2. Sequence alignment of the PMT gene fragments derived from ten tobacco varieties. Identical nucleotides in the alignment are marked with a positive (+), while the non-identical nucleotides are marked with a negative (-). Single nucleotides insertion/deletion within the PMT gene sequences of Virginia tobacco varieties are boxed.

Analisis Pengelompokan

Hasil analisis matrik jarak memperlihatkan bahwa persentase perbedaan diantara runutan basa-runutan basa yang berasal dari sepuluh varietas tembakau berkisar antara 1% - 35% (Tabel 3) atau 14 runutan basa yang dianalisis memiliki persentase kesamaan berkisar antara 65% - 99%. Kesamaan runutan basa yang cukup tinggi mengindikasikan bahwa runutan basa DNA dari sepuluh varietas tembakau yang dianalisis adalah fragmen gen *PMT* yang terkait dengan biosintesis nikotin pada tembakau. Selain itu, kesamaan runutan basa yang lebih tinggi dari 60% juga mengindikasikan bahwa runutan basa fragmen gen *PMT* dari varietas-varietas yang diuji sangat terkonservasi dan fungsi dari gen *PMT* dipertahankan dalam spesies *N. tabacum*. Stabilitas gen *PMT* dalam genom spesies tanaman tembakau diduga terkait dengan fungsi nikotin bagi

tanaman, yaitu sebagai senyawa metabolit sekunder untuk pertahanan tanaman terhadap serangga hama (Winz and Baldwin 2001; Kidd et al. 2006).

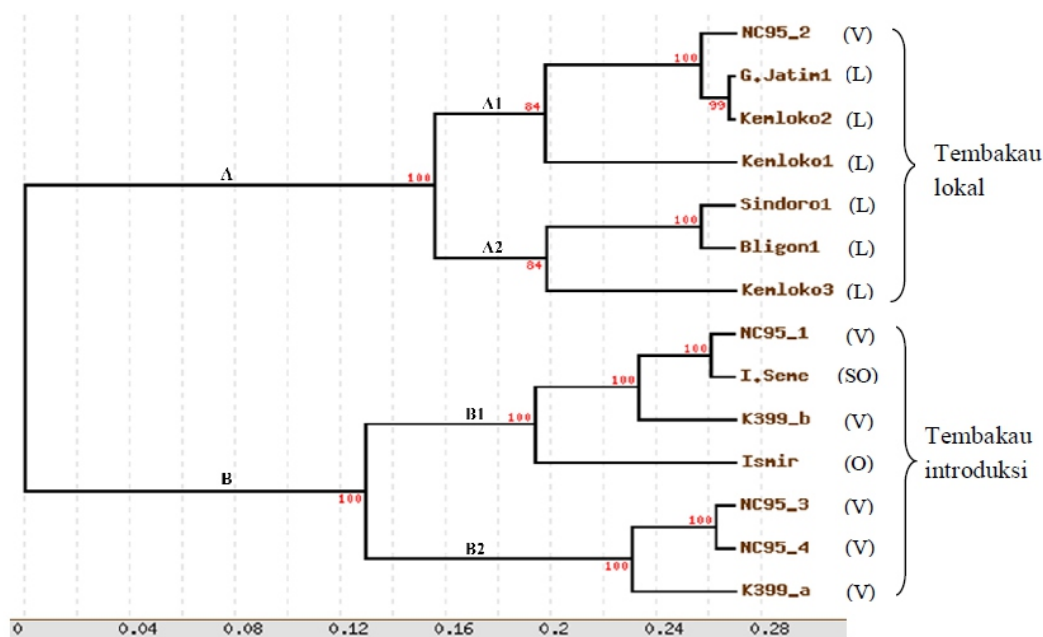
Analisis pengelompokan membagi runutan basa-runutan basa gen *PMT* menjadi dua kelompok: A dan B (Gambar 3). Kelompok A terdiri dari runutan basa-runutan basa yang mayoritas berasal dari tembakau lokal dengan tingkat kadar nikotin sedang sampai tinggi (Tabel 1), dan membentuk dua percabangan (A1 dan A2), masing-masing cabang terdiri dari tiga runutan basa. Kelompok B terdiri dari runutan basa-runutan basa yang berasal dari tembakau introduksi dengan tingkat kadar nikotin rendah sampai sedang (Tabel 1), dan membentuk dua kelompok percabangan, yaitu kelompok runutan basa tembakau oriental/semi-oriental (B1), dan kelompok runutan basa tembakau Virginia (B2) (Gambar 3).

Tabel 3. Matriks jarak genetik (%) berdasarkan 14 runutan basa yang berasal dari DNA genom sepuluh varietas tembakau.
Tabel 3. Genetic-distance matrix (%) based on 14 sequences derived from gDNA of ten tobacco varieties.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	NC95_2	0.00													
2	NC95_1	0.22	0.00												
3	NC95_3	0.35	0.16	0.00											
4	NC95_4	0.35	0.17	0.01	0.00										
5	K399_a	0.31	0.13	0.04	0.04	0.00									
6	K399_b	0.25	0.04	0.19	0.19	0.15	0.00								
7	Ismir	0.27	0.07	0.11	0.12	0.14	0.09	0.00							
8	I.Seme	0.22	0.01	0.15	0.16	0.12	0.03	0.06	0.00						
9	G.Jatim1	0.01	0.22	0.34	0.34	0.31	0.25	0.27	0.21	0.00					
10	Sindoro1	0.16	0.30	0.21	0.22	0.24	0.33	0.25	0.29	0.15	0.00				
11	Bligon1	0.15	0.31	0.22	0.22	0.25	0.33	0.25	0.30	0.14	0.01	0.00			
12	Kemloko1	0.08	0.28	0.28	0.29	0.32	0.30	0.22	0.27	0.07	0.09	0.08	0.00		
13	Kemloko2	0.01	0.22	0.34	0.34	0.30	0.24	0.27	0.21	0.01	0.15	0.14	0.07	0.00	
14	Kemloko3	0.09	0.25	0.27	0.28	0.24	0.27	0.29	0.24	0.08	0.08	0.07	0.15	0.08	0.00

Hasil analisis memperlihatkan bahwa runutan basa-runutan basa fragmen gen *PMT* mengelompok berdasarkan tipe tembakau yang memiliki tingkat kisaran kandungan nikotin yang sama, yaitu: 1) kelompok tipe tembakau yang memiliki kisaran kandungan nikotin rendah sampai sedang (tembakau introduksi), dan 2) kelompok tipe tembakau dengan kisaran kandungan nikotin sedang sampai tinggi (tembakau lokal) (Tabel 1; Gambar 3). Salah satu penyebab pengelompokan ini karena adanya rekombinasi alel dari gen mayor pengendali biosintesis nikotin pada masing-masing tipe tembakau. (Legg dan Collins 1971) melaporkan bahwa aktivitas gen-gen penyandi enzim yang terkait dengan

lintasan biosintesis nikotin dikendalikan oleh dua lokus semi-dominan *A* dan *B*. Analisis genetik yang telah dilakukan oleh Hibi (1994) pada kedua lokus tersebut memperlihatkan bahwa aktivitas lokus *B* 2.4 kali lebih tinggi dari lokus *A*, dimana tanaman tembakau dengan genotipe *AABB* berkadar nikotin tertinggi dan sebaliknya tanaman tembakau dengan genotipe *aabb* berkadar nikotin terendah. Genotipe-genotipe heterozigot mengekspresikan gen *PMT* pada level yang bervariasi sesuai rekombinasi alel yang dihasilkan (Reed dan Jelesko 2004; Dewey dan Xie 2013).



Gambar 3. Pohon kekerabatan berdasarkan runutan basa fragmen gen *PMT* asal DNA genom dari sepuluh varietas tembakau. Nilai yang tertulis di sumbu X adalah nilai skala yang mewakili jarak genetik dan setara dengan substitusi basa per situs. Angka pada percabangan adalah nilai *bootstrap* (1000 ulangan). L=lokal, O=Oriental, SO=Semi-oriental, dan V=Virginia

Figure 3. Phylogenetic tree based on DNA sequence of *PMT* gene fragment derived from ten tobacco varieties. Value in the X-axis is the scale value that represent genetic-distance and equal with one nucleotide substitution. Bootstrap values based on 1000 replicates are indicated at the branches. L=local, O=oriental, SO=semi-oriental, and V=virginia.

Analisis pengelompokan juga memisahkan runutan basa-runtutan basa yang berasal dari tembakau Virginia dan menempatkannya pada tiga kelompok yang terpisah (A1, B1, dan B2). Dua (NC95_1 dan NC95_2) dari empat runutan basa gen *PMT* asal varietas NC95 memisah pada cabang yang berbeda. Runutan basa NC95_1 mengelompok dalam kelompok tembakau oriental/semi-oriental, sedangkan runutan basa lainnya (NC95_2) mengelompok dalam kelompok tembakau lokal (Gambar 3). Satu (K399_b) dari dua runutan basa yang berasal dari varietas K399 memisah dan membentuk kelompok dengan runutan basa-runtutan basa dari tembakau oriental/semi-oriental (Gambar 3). Pemisahan tiga dari enam runutan basa gen *PMT* asal tembakau Virginia dan pembentukan empat sub cabang baru (A1, A2, B1, dan B2) pada filogram mengindikasikan adanya perbedaan runutan basa dan adanya mutasi pada situs-situs tertentu yang mengakibatkan insersi, delesi, atau substitusi pada runutan basa-runtutan basa yang dianalisis. Vamdamme (2009) menyatakan bahwa runutan basa gen yang memiliki persamaan jumlah basa yang berbeda akan dikelompokkan pada cabang yang sama oleh analisis kekerabatan berdasarkan metode *neighbour-joining*.

Situs-situs polimorfik yang terjadi karena perubahan basa pada runutan basa gen *PMT* yang dianalisis, diduga mengakibatkan perbedaan kisaran tingkat kandungan nikotin total yang dihasilkan oleh sepuluh varietas tembakau yang dianalisis. Morandini (2010) melaporkan bahwa perubahan basa berupa insersi atau delesi yang terjadi pada runutan basa suatu gen dapat mengakibatkan perubahan aktivitas protein dari gen tersebut. Hasil-hasil penelitian yang pernah dilakukan oleh para peneliti tembakau menggunakan genotipe-genotipe mutan dari kultivar Burley 21 yang memiliki kandungan nikotin berbeda-beda memperlihatkan bahwa variasi kandungan nikotin di daun berkorelasi dengan tingkat aktivitas enzim putresina N-metiltransferase yang disandikan oleh gen *PMT* di akar tanaman tembakau (Saunders dan Bush 1979; Hibi 1994; Reed dan Jelesko 2004), sehingga sejalan dengan hasil penelitian ini. Varietas tembakau dengan kriteria tingkatan kadar nikotin yang sama dan memiliki persamaan jumlah basa yang berbeda, mengelompok dalam satu cabang yang sama (Gambar 3), yang mengindikasikan bahwa perubahan yang terjadi pada situs-situs runutan basa dari fragmen gen *PMT* penyandi enzim putresina N-metiltransferase dapat mengakibatkan perubahan pem-

bacaan runutan asam amino penyusun protein yang berasosiasi dengan pembentukan nikotin di akar tanaman tembakau. Informasi tentang keterkaitan antara perubahan basa pada fragmen parsial gen *PMT* dengan kandungan nikotin total dari sepuluh varietas tembakau yang dianalisis dapat digunakan untuk memetakan atau mengidentifikasi adanya mutasi pada runutan basa parsial gen *PMT*, yang berasosiasi dengan kandungan nikotin total pada varietas-varietas tembakau komersial.

KESIMPULAN

Sepuluh varietas tembakau mengelompok sesuai dengan keragaman runutan basa dari parsial gen *PMT* masing-masing varietas. Varietas-varietas yang memiliki tingkatan kadar nikotin sama, mengelompok dalam satu kelompok atau satu cabang yang sama, karena adanya persamaan dalam perubahan runutan basa parsial gen *PMT* (penyandi enzim putresina N-metiltransferase dalam lintasan biosintesis nikotin). Hasil penelitian ini memberikan peluang untuk merakit marka-marka molekuler berbasis mutasi sebagai alat bantu seleksi terhadap karakter kadar nikotin pada program pemuliaan tanaman tembakau.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Litbang Pertanian yang telah membiayai penelitian ini melalui proyek kerjasama penelitian antara Badan Litbang Pertanian dengan Institut Pertanian Bogor (KKP3T) TA. 2010, dan DIPA Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat TA.2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Basuki, S., Suwarso, Yulaikah, S. & Rochman, F. (2005). Status Plasma Nutfah Tanaman Tembakau (*Nicotiana sp.*) dalam: Buku Pedoman Pengelolaan Plasma Nutfah (editor: Luntungan, H.T., Karmawati, E., & Hartati, Rr.). Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Halaman: 183-200.
- Basuki, S., Mattjik, N.A., Suwarso, Wurnas, D. & Sudarsono (2011) Isolasi fragmen gen penyandi putresin N-metil transferase dan quinolinat fosforibosiltransferase asal tembakau lokal Temanggung (*Nicotiana tabacum*). Jurnal Littri. 17:109-117.
- Bombarely, A., Rosli, H.G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L. & Martin, G. (2012) A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25:1523-1530.
- Bowman, D., Corbin, T. & Tart, G. (1984) TOBACCO Measured Crop Performance. Res Rep (97). NC State Univ. 32 pps.
- Champell, N.A., Reece, J.B., Taylor, M.A., Simon, E.J., Dickey, J.L. & Hogan, K. (2015) *Biology eighth edition*. Pearson Ed. Inc. USA. 780 pp.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B. & McVean, G.A.T. (2001) Genome sequences and evolutionary biology, a two-way interaction. *Trends in Ecology & Evolution*. 16: 235–242.
- Chen, S., Matsubara, K., Omori, T., Kokubun, H., Kodama, H., Watanabe, H., Hashimoto, G., Marchesi, E., Bullrich, L. & Ando, T. (2007) Phylogenetic analysis of the genus *Petunia* (*Solanaceae*) based on the sequence of the *Hf1* gene. *Journal of Plant Research (Japan)*. 120:385-397.
- Dekkers, J.C.M. & Hospital, F. (2002) The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat Rev Genet*. 3:22–32.
- Dewey, R.E. & Xie, J. (2013) Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*. 94:10–27.
- Edwards, D. & Batley, J. (2010) Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*. 8:2–9.
- Hashimoto, T., Shoji, T., Mihara, T., Oguri, H., Tamaki, K., Suzuki, K.I. & Yamada, Y. (1998) Intraspecific variability of the tandem repeats in *Nicotiana putrescine* N-methyltransferases. *Plant Molecular Biology*. 37:25–37.
- Hibi, N. (1994) Gene Expression in Tobacco Low-Nicotine Mutants. *the Plant Cell Online*. 6:723–735.
- Kidd, S.K., Melillo, A.A., Lu, R., Reed, D.G., Uchida, K., Furuya, M. & Jelesko, J.G. (2006) The *A* and *B* loci in tobacco regulate a network of stress response genes, few of which are associated with nicotine biosynthesis. *Plant Molecular Biology*. 60:699–716.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5:150–163.
- Leffingwell, J.C. (1999) Leaf Chemistry Basic Chemical Constituents of Tobacco Leaf and Differences among Tobacco Types. Dalam: DAVIS D.L. and M.T. NIELSEN (ed.) Tobacco, Production, Chemistry, and Technology. Cambridge (GB) Univ. Pr. p. 265–284.
- Legg, P.D. & Collins, G.B. (1971) Genetic Parameters in Burley Populations of *Nicotianatabacum* L. I. ‘Ky 10’ × ‘Burley 21’1. *Crop Science*. 11:365–367.
- McGinnis, S. & Madden, T.L. (2004) BLAST: At the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 32:20–25.
- Moore, J.M. (2013) Tobacco Variety Information. <http://www.caes.uga.edu/tobacco/2013>.
- Morandini, P. (2010). Inactivation of allergens and toxins. *New Biotechnology*. 27:483-491.

- SK. Menteri Pertanian (2001) Pelepasan Varietas Unggul Tembakau Sindoro1. *SK. Menteri Pertanian No.112/Kpts/TP.240/2/2001*. Hal. 3.
- _____. (2001a) Pelepasan Varietas Unggul Tembakau Kemloko1. *SK. Menteri Pertanian No.113/Kpts/TP.240/2/2001*. Hal. 3
- _____. (2005) Pelepasan Varietas Unggul Tembakau Kemloko 2. *SK. Menteri Pertanian No.309/Kpts/SR.120/8/2005*. Hal.3.
- _____. (2005a) Pelepasan Varietas Unggul Tembakau Kemloko 3. *SK. Menteri Pertanian No.310/Kpts/SR.120/8/2005*. Hal.3.
- _____. (2007) Pelepasan Varietas Unggul Tembakau Bligon1.*SK. Menteri Pertanian No.127/Kpts/SR.120/2/2007*.Hal.3.
- _____. (2007a) Pelepasan Varietas Unggul Tembakau Grompol Jatim1.*SK. Menteri Pertanian No.131/Kpts/SR.120/2/2007*. Hal.3.
- Reed, D.G. & Jelesko, J.G. (2004) The *A* and *B* loci of *Nicotiana tabacum* have non-equivalent effects on the mRNA levels of four alkaloid biosynthetic genes. *Plant Science*. 167:1123–1130.
- Robertson, K., Goldberg, E.E. & Igić, B. (2011) Comparative evidence for the correlated evolution of polyploidy and self-compatibility in *solanaceae*. *Evolution*. 65:139–155.
- Rochman, F. (2013) Pengembangan varietas unggul tembakau temanggung tahan penyakit. *Jurnal Litbang Pertanian*. 32:30–38.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 4:406–425.
- Saunders, J.W. & Bush, L.P. (1979) Nicotine biosynthetic enzyme activities in *Nicotiana tabacum* L. genotypes with different alkaloid levels. *Plant Physiology*. 64:236–240.
- Tate, J.A., Acosta, M.C., McDill, J., Moscone, E.A., Simpson, B.B. & Cocucci, A.A. (2009) Phylogeny and Character Evolution in *Nierembergia* (*Solanaceae*): Molecular, Morphological, and Cytogenetic Evidence. *Systematic Botany*. 34:198–206.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 22: 4673–4680.
- Vamdamme, A. (2009) Basic concepts of molecular evolution. *Dalam: Lemey P., Salemi M., Vamdamme A.M. (ed.) The phylogenetic handbook*. Cambridge (GB)Univ. Pr. p. 3-28.
- Winz, R.A. & Baldwin, I.T. (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant physiology*. 125:683–700.
- Wu, F. & Tanksley, S.D. (2010) Chromosomal evolution in the plant family *Solanaceae*. *BMC Genomics*. 11:182.